



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 1/14, C12P 7/42, 7/24 // (C12N 1/14, C12R 1:685)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/61721 (43) Date de publication internationale: 19 octobre 2000 (19.10.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00966 (22) Date de dépôt international: 14 avril 2000 (14.04.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/04644 14 avril 1999 (14.04.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de L'Université, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BONNIN, Estelle [FR/FR]; 8, rue Aimé Penel, F-44700 Orvault (FR). LESAGE-MEESSEN, Laurence [FR/FR]; 7, parc de la Serane, F-13008 Marseille (FR). STENTELAIRE, Christelle [FR/FR]; 9, allée du Fouis, Les Terrasses des Cadenières, F-13127 Vitrolles (FR). ASTHER, Marcel [FR/FR]; 28, avenue du Peymian, F-13600 La Ciotat (FR). THIBAULT, Jean-François [FR/FR]; 2, rue de la Rotonde, F-44700 Orvault (FR). (74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A. NIGER CULTURES AND THEIR USES FOR PRODUCING FERULIC ACID AND VANILLIC ACID (54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE CULTURES D'A. NIGER ET LEURS UTILISATIONS POUR LA PRODUCTION D'ACIDE FERULIQUE ET D'ACIDE VANILLIQUE (57) Abstract <p>The invention concerns a method for obtaining A.niger cultures with wide enzymatic activity spectrum, by culturing A. niger in the presence of beetroot pulp, cereal bran or fractions thereof. The resulting cultures can be used for producing ferulic acid and vanillic acid from agricultural joint products.</p> (57) Abrégé <p>L'invention est relative à l'obtention de cultures d'A. niger à large spectre d'activité enzymatique, par mise en culture d'A. niger en présence de pulpe de betterave, de son de céréales ou de leurs fractions. Les cultures obtenues de la sorte sont utilisables pour la production d'acide férulique et d'acide vanillique à partir de co-produits agricoles.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCÉDÉ D'OBTENTION DE CULTURES D'A. NIGER ET LEURS
UTILISATIONS POUR LA PRODUCTION D'ACIDE FÉRULIQUE ET
D'ACIDE VANILLIQUE

La présente Invention est relative à
5 l'obtention d'acide férulique et d'acide vanillique par
bioconversion.

La vanilline, qui est actuellement l'arôme le
plus utilisé dans les industries agro-alimentaires, peut
avantageusement être produite par bioconversion d'acide
10 férulique ou d'acide vanillique (qui est lui-même un
produit de bioconversion de l'acide férulique), à l'aide
de champignons filamenteux.

Ainsi, la Demande de brevet européen 453 368
au nom de la Société PERNOD-RICARD, décrit la production
15 de vanilline naturelle par bioconversion d'acide
férulique ou d'acide vanillique, en présence d'un
champignon filamenteux du groupe des Basidiomycètes,
Pycnoporus cinnabarinus. La Demande PCT WO/96/08576 au
nom de l'INRA, décrit un procédé de bioconversion en 2
20 étapes, permettant d'obtenir un rendement plus élevé.
Dans la première étape, l'acide férulique est converti en
acide vanillique par un champignon filamenteux
(Ascomycète, Basidiomycète ou Actinomycète) ; l'acide
vanillique obtenu est ensuite converti en vanilline par
25 un Basidiomycète.

L'acide férulique, qui constitue le produit de
départ de ces procédés de bioconversion, est l'un des
composés phénoliques majeurs de la paroi cellulaire des
végétaux. Il a été décrit chez les monocotylédones,
30 notamment les céréales (blé, maïs,...), ainsi que chez
les dicotylédones de la famille des Chénopodiacées
(betterave, épinard,...). Il est généralement estérifié
aux polysaccharides de la paroi végétale, par
l'intermédiaire de l'arabinose ou du galactose dans les
35 pectines de betterave, ou de l'arabinose dans les
arabinoxylanes de céréales.

L'acide férulique est présent dans divers co-produits agricoles : par exemple, les sons de blé (résidus de la meunerie) et de maïs (résidus de la semoulerie) et les pulpes de betterave (résidus de l'industrie du sucre), contiennent de 0,6 à 4% d'acide férulique. Ces produits constituent des sources potentielles facilement disponibles et peu coûteuses d'acide férulique.

Bien qu'il soit théoriquement envisageable, dans le cadre de la mise en œuvre des procédés de bioconversion décrits dans la Demande EP 0 453 368 ou la demande PCT WO/96/08576 de produire de l'acide vanillique directement à partir d'acide férulique estérifié aux polysaccharides, le taux de bioconversion dans ces conditions est négligeable.

L'acide férulique doit donc être préalablement libéré par des férulate estérases. Selon la nature du polysaccharide portant l'acide férulique, la liaison acide férulique-ose est différente : l'acide férulique forme une liaison ester avec le O-5 de l'arabinose dans les arabinoxylanes de céréales, alors que dans le cas des pectines de betterave, l'acide férulique est porté soit par le O-2 de l'arabinose, soit dans une moindre mesure par le O-6 du galactose. La libération de l'acide férulique impliquera donc des enzymes différentes selon la nature de la liaison à rompre : les principales férulate estérases mises en évidence chez *A. niger* sont indiquées dans le Tableau I ci-dessous.

Tableau I

Enzyme	Origine	Substrat préférentiel
FAE I	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-2 /galactose féruloylé en O-6
FAEII	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-5
FAEIII	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-5
CinnAE	<i>Aspergillus niger</i>	arabinose féruloylé en O-2

En outre, les férulate estérases n'agissent pas directement sur les polysaccharides des parois végétales : les liaisons existant entre les oses au sein des polysaccharides pariétaux doivent préalablement être

rompues pour que l'acide férulique puisse être libéré par les férulate estérases. Etant donné la diversité des polysaccharides pariétaux, la rupture de ces liaisons nécessite un grand nombre d'activités enzymatiques différentes dont les principales sont : polygalacturonase, rhamnogalacturonase, arabinanase, galactanase, xylanase et glucanase. Les produits d'hydrolyse libérés par ces enzymes sont à leur tour dégradés par des osidases (arabinofuranosidase et galactosidase) et l'acide férulique est libéré par des férulate estérases.

Des mélanges enzymatiques permettant de libérer l'acide férulique présent dans les polysaccharides pariétaux des pulpes de betterave ou des sons de céréales sont commercialisés. Toutefois, ces mélanges enzymatiques n'ont pas une activité férulate estérase suffisante, et doivent être supplémentés en férulate estérases extraites de milieux de culture microbiens. En outre, une fois l'acide férulique libéré, sa purification implique de nombreuses étapes, longues et coûteuses, de séparation liquide/solide et liquide/liquide.

Or les Inventeurs sont maintenant parvenus à induire chez *Aspergillus niger* la production d'enzymes à large spectre d'activité, permettant non seulement une libération efficace de l'acide férulique, mais en outre la production directe d'acide vanillique naturel à partir de co-produits agricoles.

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention de cultures d'*Aspergillus niger* à large spectre d'activité enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'au moins une souche d'*Aspergillus niger* en présence d'au moins une source carbonée inductrice choisie dans le groupe constitué par :

- la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide ;

- un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de
5 sons de différentes céréales, ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par autoclavage dudit son ou dudit mélange.

10 Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, ladite source carbonée inductrice est présente dans ledit milieu de culture à une concentration comprise entre 1 et 50 grammes (poids sec), et de préférence entre 2,5 et 30 grammes par litre de milieu de culture.

15 Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, la culture d'*Aspergillus niger* comprend au moins la souche CNCM I-1472, déposée le 31 août 1994 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, 26 rue du Docteur Roux,
20 Paris).

La présente invention a aussi pour objet :

- un procédé d'obtention d'une préparation enzymatique à large spectre d'activité, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'au moins une souche
25 d'*Aspergillus niger* selon le procédé défini ci-dessus, et la récupération du surnageant de culture ;

- une préparation enzymatique susceptible d'être obtenue par ledit procédé.

La récupération du surnageant de culture peut
30 s'effectuer par tous moyens connus en eux-mêmes, tels que centrifugation ou filtration, qui permettent de séparer les cellules d'*Aspergillus niger* du milieu de culture. Une préparation enzymatique conforme à l'invention peut être constituée par le surnageant lui-même, ou par un
35 concentré dudit surnageant, obtenu par exemple par ultrafiltration ou par lyophilisation.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de production d'acide férulique libre à partir d'un substrat féruloyle, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit substrat
5 avec au moins une culture d'*Aspergillus niger* préalablement obtenue selon le procédé conforme à l'invention, ou avec au moins une préparation enzymatique conforme à l'invention, dans des conditions permettant la libération de l'acide férulique par les enzymes présentes
10 dans ladite culture ou ladite préparation enzymatique.

Au sens de la présente invention, on entend par : « substrat féruloyle », tout produit contenant ou constitué par au moins un polysaccharide féruloyle et/ou au moins un oligosaccharide féruloyle. Il s'agit
15 notamment de tout substrat d'origine végétale comprenant des polysaccharides pariétaux féruloylés et/ou des oligosaccharides féruloylés.

Dans le cas où le substrat végétal comprend principalement des polysaccharides pariétaux insolubles,
20 on pourra avantageusement les rendre plus accessibles à l'hydrolyse enzymatique, en les soumettant préalablement à un traitement chimique tel qu'une hydrolyse acide ou alcaline, et/ou à un traitement physique tel que l'autoclavage ou la cuisson-extrusion.

25 A titre de substrats végétaux particulièrement avantageux pour la mise en œuvre de la présente invention, on citera notamment :

- de la pulpe de betterave ou ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles
30 d'être obtenues par hydrolyse acide ;
- un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de sons de différentes céréales, ou leurs fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par autoclavage.

35 La mise en contact du substrat féruloyle avec au moins une souche d'*Aspergillus niger* préalablement

cultivée conformément à l'invention peut s'effectuer en ajoutant au milieu de culture d'*Aspergillus niger* une quantité dudit substrat féruloyle correspondant par exemple à un apport de 0,1 à 50 g d'acide férulique par litre de milieu de culture. De préférence, la quantité de substrat féruloyle ajoutée au milieu de culture correspond à un apport de 1 à 20 g, et avantageusement à un apport de 5 à 15 g d'acide férulique par litre de milieu de culture.

La mise en contact du substrat féruloyle avec au moins une préparation enzymatique conforme à l'invention peut s'effectuer en mélangeant ladite préparation enzymatique avec ledit substrat féruloyle, par exemple dans des proportions correspondant à un apport, par ledit substrat, de 0,1 à 40 g d'acide férulique pour 1 gramme de protéines totales de préparation enzymatique. De préférence, les proportions du mélange correspondent à un apport de 0,2 à 10 g et avantageusement de 0,5 à 5 g d'acide férulique, pour 1 gramme de protéines totales de la préparation enzymatique.

La quantité de substrat féruloyle ajoutée au milieu de culture ou à la préparation enzymatique varie notamment en fonction de la nature dudit substrat et de sa teneur initiale en acide férulique estérifié. Cette teneur peut être facilement déterminée par toute méthode connue en elle-même de l'homme de l'art, par exemple par la méthode décrite par SAULNIER et al. [Carbohydrate Research, 272, 241-253, (1995)].

Ledit substrat féruloyle peut être ajouté en une seule fois, en plusieurs fois par ajouts successifs, ou bien en continu.

Avantageusement, pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, on utilisera une culture d'*Aspergillus niger* ou une préparation enzymatique produites en présence d'une source carbonée inductrice

comprenant de la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide, et un substrat féruloylé comprenant au moins un son de céréale, notamment de maïs, ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés, obtenues par autoclavage.

L'acide férulique produit dans ces conditions peut, si on le souhaite, être recueilli à partir du milieu de culture. Cependant, il est particulièrement avantageux d'effectuer directement la bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique, par la même culture d'*Aspergillus niger*, dont les cellules possèdent les enzymes intracellulaires nécessaires à cette bioconversion.

L'acide férulique ou l'acide vanillique obtenus conformément à l'invention pourront être utilisés tels quels, par exemple comme antioxydants, ou bien pourront être utilisés comme précurseurs de vanilline dans des procédés de bioconversion tels que ceux décrits dans la Demande EP 0 453 368 ou la Demande PCT WO/96/08576).

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé conforme à l'Invention.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : ACTIVITÉ ENZYMATIQUE D'A. NIGER I-1472 CULTIVÉ SUR PULPE DE BETTERAVE :

A) Réalisation des cultures d'*Aspergillus niger* I-1472

La souche d'*Aspergillus niger* déposée le 31 Août 1994 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, sous le numéro I-1472, a été mise en

culture en présence de co-produits agricoles ou de leurs fractions comme sources carbonées inductrices d'enzymes d'intérêt.

La composition du milieu de culture est la

5 suivante :

Source carbonée inductrice	15,00 g/L
Maltose	2,50 g/L
Tartrate diammonium	1,842 g/L
KH ₂ PO ₄	0,20 g/L
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,0132 g/L
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,50 g/L
Extrait de levure	0,50 g/L
Tween 80	0,50 g/L

De la pulpe de betterave est utilisée comme source de carbone inductrice.

La composition de la pulpe de betterave (poids sec) est la suivante :

10	Rhamnose	24 mg/g
	Arabinose	209 mg/g
	Xylose	17 mg/g
	Galactose	51 mg/g
	Glucose	211 mg/g
15	Acides uroniques	211 mg/g
	Acide férulique	8 mg/g
	Protéines	113 mg/g
	Cendres	36 mg/g

20 Une culture témoin est réalisée sur maltose (20 g/L) comme seule source de carbone. Le milieu est stérilisé par autoclavage 20 minutes à 120°C. Les cultures se déroulent en fioles de 500 mL contenant 200 mL de milieu. L'inoculation est effectuée par des conidiospores ($2,10^5$ spores/mL). Après inoculation, les
25 cultures sont incubées à 30°C et soumises à une agitation de 120 tours/minute.

La production d'enzymes au cours de la culture est suivie par le dosage des activités enzymatiques

produites. Pour procéder à ce dosage, un aliquot du milieu de culture d'environ 10 mL est prélevé stérilement chaque jour. Cet aliquot est ensuite filtré sur fibres de verre, et les activités enzymatiques vis-à-vis de différents substrats sont dosées.

B) Dosage des activités enzymatiques

1) Enzymes de dépolymérisation

Les activités enzymatiques sont mesurées sur différents polysaccharides purs : galacturonane, carboxyméthylcellulose, xylane, galactane de type I, arabinane, rhamnogalacturonane.

Le milieu réactionnel contient 0,9 mL de solution de substrat à 1 g/L dans le tampon acétate 50 mmol/L pH 4,5 et 0,1 mL de filtrat de culture. Le mélange est incubé 10 minutes à 40°C. Les extrémités réductrices libérées sont dosées en microplaques par le sulfate de cuivre [NELSON, J. Biol. Chem. 153, 375-380 (1944) ; STURGEON, Methods in Plant Biochemistry, 2, 1-37 (1990)]. L'ose constitutif du polysaccharide est utilisé comme standard : acide galacturonique pour les dosages sur galacturonane et rhamnogalacturonane, glucose pour les dosages sur carboxyméthylcellulose, xylose pour les dosages sur xylane, galactose pour les dosages sur galactane et arabinose pour les dosages sur arabinane.

2) Activités osidases

Les activités osidases sont mesurées sur para-nitrophényl- β -D-galactopyranoside et para-nitro-phényl- α -L-arabinofuranoside (SIGMA).

Le milieu réactionnel contient 0,1 mL de solution de substrat à 4 mmol/L dans le tampon acétate 50 mmol/L pH 4,5 et 0,1 mL de filtrat du surnageant de culture. Le mélange est incubé 20 minutes à 40°C. 0,6 mL de carbonate de sodium sont alors ajoutés pour inhiber l'activité enzymatique et permettre le développement de la réaction colorimétrique. La concentration en para-

nitrophénol libéré est calculée à partir de la densité optique du mélange lue à $\lambda = 400 \text{ nm}$.

3) Activités férulate estérase

Les activités des férulate estérases sont mesurées sur différents oligomères féruloylés : 5-O-(transféruloyl)-L-Araf (détermination de l'activité FA) et O- β -D-Xyl_n(1→2)-[5-O-(transféruloyl)- α -L-Araf] (détermination de l'activité XFA) isolés de son de maïs [SAULNIER et al., Carbohydrate Research, 272, 241-253, (1995)], et [2-O-(transféruloyl)- α -L-Araf (détermination de l'activité FA₂) isolés de pulpe de betterave [KROON et al., Carbohydrate Research, 300, 351-354, (1997)]. Le dosage est effectué à l'optimum des activités spécifiques des autres enzymes.

Le milieu réactionnel contient 100 μl de solution de substrat à 70 nmoles/L, 80 μl de tampon MOPS (3-N-morpholino-propane sulfonique) 0,1 mole/L, pH 6, et 20 μl de filtrat de culture. Le mélange est incubé 1 heure à 40°C. Aux temps : 0, 15, 30, 45, 60 minutes, 10 μl de milieu réactionnel sont prélevés et versés dans du tampon MOPS. Les densités optiques sont lues à 286 et 323 nm.

Le milieu réactionnel contient à la fois de l'acide férulique estérifié et de l'acide férulique libéré par l'enzyme. Leurs quantités respectives sont calculées à partir des densités optiques en utilisant les coefficients d'extinction molaires préalablement déterminés à pH 6 : $\epsilon_{286} = 14176 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{323} = 10350 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour l'acide férulique libre, et $\epsilon'_{286} = 12465 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon'_{323} = 19345 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour l'acide férulique estérifié.

Toutes les activités enzymatiques sont exprimées en nkat/mL, ce qui correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une nmole de produit par seconde et par mL, dans les conditions de pH et de température définies ci-dessus.

C) Résultats

La production d'enzymes dégradant les polysaccharides pariétaux a été suivie au cours de la culture d'*A. niger* sur pulpe de betterave et au cours de la culture témoin sur maltose. Les activités enzymatiques ont été mesurées comme décrit ci-dessus.

1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

Les résultats obtenus pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 1, qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

Légende de la Figure 1 :

Figure 1A : Induction sur pulpe de betterave ;

Figure 1B : Induction sur maltose ;

● : Galactane ;

■ : Arabinane ;

▲ : Acide polygalacturonique ;

○ : CarboxyMéthylCellulose ;

□ : Xylane ;

▼ : Rhamnogalacturonane ;

× : pNPGalactoside ;

• : pNPArabinoside.

Lorsque le maltose seul est utilisé comme source carbonée dans les cultures d'*A. niger* I-1472, très peu d'activités enzymatiques actives sur les polysaccharides pariétaux sont libérées. Par contre, la présence de pulpe de betterave comme source carbonée inductrice conduit à une synthèse beaucoup plus importante d'enzymes dégradant les polysaccharides pariétaux. Un large spectre d'enzymes est présent dans le surnageant de culture. D'autre part, la synthèse de ces enzymes est rapide et l'on observe que les activités enzymatiques atteignent leur valeur maximum dès le 3ème jour de culture. Pour cette raison, les activités

férulate estérases ont été recherchées dans les surnageants de culture à 3 jours.

2) Férulate estérases

Les activités férulate estérases dans les surnageants de culture sont indiquées dans le Tableau II suivant:

Tableau II

Source carbonée inductrice	Activité (nkat/mL)		
	FA	FAX	FA ₂
Témoin Maltose	0	0	0
Pulpe de betterave	1,1	0,5	0

Une faible activité FA et FAX est donc induite lors de la culture d'*A. niger* I-1472 sur pulpe de betterave.

EXEMPLE 2 : ACTIVITÉS ENZYMATIQUES D'*A. niger* I-1472 CULTIVÉ SUR HYDROLYSATS DE PULPE DE BETTERAVE

La pulpe de betterave subit deux hydrolyses successives par de l'acide trifluoroacétique pour en extraire les oligomères féruloylés, selon le protocole suivant [RALET et al. Carbohydrate Research, 263, 227-241 (1994)] :

800 g de pulpe de betterave sont mélangés à raison de 20 g/L à une solution d'acide trifluoroacétique 50 mmol/L. Le mélange est maintenu à 100°C pendant 1h30. La fraction soluble est recueillie, et précipitée par addition de 4 volumes d'éthanol. La fraction soluble dans l'éthanol est recueillie, et constitue l'hydrolysat 1.

Le précipité est traité par l'acide trifluoroacétique (150 mmol/L) pendant 6 heures à 100°C. La fraction soluble est recueillie, et précipitée par addition de 4 volumes d'éthanol. La fraction soluble dans l'éthanol est recueillie et constitue l'hydrolysat 2.

Les fractions notées : « hydrolysat 1 » et : « hydrolysat 2 » sont obtenues avec des rendements de 280 mg/g pour l'hydrolysat 1 et de 76 mg/g pour

l'hydrolysat 2, et ont les compositions (poids sec) suivantes :

Hydrolysat :		1	2
	Rhamnose	6 mg/g	54 mg/g
5	Arabinose	535 mg/g	129 mg/g
	Xylose	2 mg/g	2 mg/g
	Galactose	16 mg/g	187 mg/g
	Glucose	85 mg/g	42 mg/g
	Acides uroniques	17 mg/g	188 mg/g
10	Acide férulique	10 mg/g	12 mg/g
	Protéines	12 mg/g	8 mg/g
	Cendres	64 mg/g	86 mg/g

Les hydrolysats 1 ou 2 sont ensuite utilisés comme sources carbonées inductrices dans une culture d'*A. niger* I-1472, et les enzymes produites par le champignon sont mesurées selon les protocoles décrits à l'exemple 1.

1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

Les résultats obtenus pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 2 qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

Légende de la Figure 2 :

Figure 2A : Induction sur hydrolysat 1;

Figure 2B : Induction sur hydrolysat 2 ;

● : Galactane ;

■ : Arabinane ;

▲ : Acide polygalacturonique ;

○ : CarboxyMéthylCellulose ;

□ : Xylane ;

▼ : Rhamnogalacturonane ;

× : pNPGalactoside ;

• : pNPArabinoside.

Lorsque les hydrolysats 1 ou 2 de pulpe de betterave sont utilisés comme sources carbonées inductrices dans les cultures d'*A. niger* I-1472, la

production d'enzymes dégradant les polysaccharides pariétaux est plus faible que dans les cultures sur pulpe de betterave. Les hydrolysats induisent donc la synthèse de quantités plus faibles d'enzymes. D'autre part, on observe que les activités enzymatiques atteignent leur valeur maximale après 4 jours de culture sur l'hydrolysat 1, et après 3 jours sur l'hydrolysat 2.

2) Férulate estérases

Les activités férulate estérases ont été mesurées dans les surnageants du 3ème jour de culture pour l'hydrolysat 2, et du 4ème jour de culture pour l'hydrolysat 1. Les résultats sont illustrés par le Tableau III ci-dessous.

Tableau III

Source carbonée inductrice	Activité (nkat/mL)		
	FA	FAX	FA ₂
Témoin Maltose	0	0	0
Hydrolysats 1	0,6	0	0,2
Hydrolysats 2	0	0	0

De faibles activités FA et FA₂ sont induites lors de la culture d'*A. niger* I-1472 sur l'hydrolysats 1 de pulpe de betterave, riche en acide férulique estérifié à l'arabinose.

EXEMPLE 3 : ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PRODUITES PAR *A. niger* I-1472 CULTIVÉ SUR SON DE MAÏS

A. niger I-1472 est mis en culture en présence de son de maïs en tant que source carbonée inductrice, et les enzymes produites par le champignon sont mesurées, selon les protocoles décrits à l'exemple 1.

La composition du son de maïs (poids sec) est la suivante :

	Rhamnose	0 mg/g
	Arabinose	154 mg/g
	Xylose	276 mg/g
	Galactose	51 mg/g
5	Glucose	248 mg/g
	Acides uroniques	42 mg/g
	Acide férulique	31 mg/g
	Protéines	50 mg/g

1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

10 Les résultats obtenus pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 3, qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

15 Légende de la Figure 3 :

- : Galactane ;
- : Arabinane ;
- ▲ : Acide polygalacturonique ;
- : CarboxyMéthylCellulose ;
- 20 □ : Xylane ;
- ▼ : Rhamnogalacturonane ;
- × : pNPGalactoside ;
- : pNPArabinoside.

Ces résultats montrent que dans le cas des
25 enzymes de dépolymérisation et des osidases, les activités enzymatiques induites lors de la culture en présence de son de maïs sont plus faibles que celles induites en présence de pulpe de betterave.

2) Férulate estérases

30 Les activités férulate estérases mesurées dans le surnageant après 3 jours de culture sont respectivement de 4,6 nkat/mL pour FA et 4,9 nkat/mL pour FAX. On observe une nette induction des activités FA et FAX par le son de maïs.

EXEMPLE 4 : ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PRODUITES PAR *A. NIGER* I-1472 CULTIVÉ SUR L'AUTOCLAVAT ISSU DE SON DE MAÏS

Le son de maïs subit un traitement par autoclavage pour en extraire les oligomères féruloylés
5 selon le protocole suivant :

Le son est mis en suspension dans l'eau (à raison de 100 g de son par litre), puis autoclavé à 160°C pendant 60 minutes. L'autoclavat est centrifugé pendant 10 minutes à 20 000 t/min, puis filtré sur verre fritté
10 G3 (taille des pores 15-40 µm ; SCHOTT). Le surnageant filtré est lyophilisé. Le produit final, dénommé ci-après « autoclavat de son de maïs », est obtenu avec un rendement de 600 mg/g et a la composition (poids sec) suivante :

15	Rhamnose	0 mg/g
	Arabinose	208 mg/g
	Xylose	386 mg/g
	Galactose	73 mg/g
	Glucose	39 mg/g
20	Acides uroniques	47 mg/g
	Acide férulique	34 mg/g
	Protéines	8 mg/g
	Cendres	8 mg/g

L'autoclavat est ensuite utilisé comme source
25 carbonée inductrice pour la culture d'*A. niger* I-1472 et les enzymes sont mesurées dans le surnageant de culture selon les protocoles décrits à l'exemple 1.

1) Enzymes de dépolymérisation et osidases

Les résultats obtenus pour les enzymes de
30 dépolymérisation et les osidases sont illustrés par la figure 4 qui représente l'activité d'hydrolyse pour chaque substrat testé, en fonction du nombre de jours de culture.

Légende de la Figure 4 :

- : Galactane ;
- : Arabinane ;
- ▲ : Acide polygalacturonique ;
- : CarboxyMéthylCellulose ;
- : Xylane ;
- ▼ : Rhamnogalacturonane ;
- × : pNPGalactoside ;
- : pNPArabinoside.

On constate en particulier que l'activité xylanase induite en présence d'hydrolysats de son de maïs est beaucoup plus élevée que celle induite lorsque le son de maïs natif est utilisé comme source carbonée inductrice.

2) Férulate estérases

Les activités férulate estérases mesurées dans le surnageant après 5 jours de culture, sont respectivement de 9,7 nkat/mL pour FA et de 10,6 nkat/mL pour FAX ; on observe donc une induction encore plus importante que celle observée dans le cas des cultures effectuées en présence de son de maïs.

EXEMPLE 5 : LIBÉRATION D'ACIDE FÉRULIQUE PAR LES ENZYMES D'*A. niger* I-1472

Le surnageant de cultures d'*A. niger* I-1472 cultivées en présence de pulpe de betterave comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus, et concentré 20 fois par lyophilisation, a été utilisé comme source d'enzymes pour libérer l'acide férulique présent soit dans la pulpe de betterave soit dans l'autoclavat de son de maïs.

Cette libération a été comparée avec la libération d'acide férulique par des enzymes commerciales : SP 584 (NOVO) dans le cas de la pulpe de betterave et NOVOZYM 342 (NOVO) dans le cas de l'autoclavat de son de maïs.

Le Tableau IV ci-dessous illustre la comparaison entre les activités enzymatiques présentes dans les 4 préparations d'enzymes utilisées :

Tableau IV

Substrat	Activité spécifique (nkat/mg)			
	Surnageant d' <i>A. niger</i> I-1472 sur pulpe de betterave	Surnageant d' <i>A. niger</i> sur autoclavat de son de maïs	SP 584	NOVOZYM 342
Arabinane	120,6	1,9	291,1	7,2
Xylane	125,5	93,9	62,2	104,3
Galactane	32,9	1,8	943,9	2,8
Rhamnogalacturonane	53,4	4,9	256,7	nd
CMC	13,6	12,2	4,7	24,9
Acide polygalacturonique	86,0	1,5	2400,2	0,4
pNP-Rha	12,9	nd	0,2	0,0
pNP-Gal	19,8	3,8	84,8	0,0
pNP-Ara	266,6	27,5	619,5	0,3
XFA	9,2	85,9	0,1	0,8
FA	5,8	90,4	0,1	0,2
FA2	2,4	nd	0,3	nd

5 nd : non déterminé

A) Libération de l'acide férulique contenu dans la pulpe de betterave

La dégradation enzymatique de pulpe de betterave a été réalisée en présence de 10 mg de protéines (SP 584 ou enzymes d'*A. niger* I-1472) par g de pulpe sèche, soit 10 mg de protéines pour 8 mg d'acide férulique estérifié initialement présent dans la pulpe de betterave. Après 24 h d'hydrolyse, la quantité d'acide férulique libéré par SP 584 représente 50% de cette quantité initiale d'acide férulique, et la quantité d'acide férulique libéré par les enzymes d'*A. niger* I-1472 représente 40% de cette quantité initiale. Les enzymes sécrétées par *A. niger* I-1472 sont donc légèrement moins efficaces que SP 584 pour libérer l'acide férulique présent dans la pulpe de betterave.

B) Libération de l'acide férulique contenu dans l'autoclavat de son de maïs

La dégradation enzymatique de l'autoclavat de son de maïs a été réalisée en présence de 10 mg de

protéines (NOVOZYM 342 ou enzymes d'*A. niger* I-1472) par g d'autoclavat sec, soit 10 mg de protéines pour 34 mg d'acide férulique estérifié initialement présent dans l'autoclavat de son de maïs. Après 24 h d'hydrolyse, la quantité d'acide férulique libéré par NOVOZYM 342 représente 33% de cette quantité initiale d'acide férulique, et la quantité d'acide férulique libéré par les enzymes d'*A. niger* I-1472 représente 95% de cette quantité initiale. Les enzymes sécrétées par *A. niger* I-1472 sont donc beaucoup plus efficaces que NOVOZYM 342 pour libérer l'acide férulique contenu dans l'autoclavat de son de maïs.

EXEMPLE 6 : BIOCONVERSION DIRECTE DE L'ACIDE FÉRULIQUE PRÉSENT DANS DES CO-PRODUITS AGRICOLES OU LEURS FRACTIONS, EN ACIDE VANILLIQUE PAR *A. niger* I-1472 CULTIVÉ EN PRÉSENCE DE SON DE MAÏS

A. niger I-1472 a été cultivé en présence de son de maïs comme source carbonée inductrice d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides pariétaux. La production d'acide vanillique a été suivie en utilisant respectivement l'autoclavat de maïs, la pulpe de betterave ou ses hydrolysats comme substrat végétal source d'acide férulique.

Conditions de bioconversion d'acide férulique en acide vanillique

La souche d'*A. niger* I-1472 a été cultivée dans les mêmes conditions de culture que celles décrites préalablement pour la production d'enzymes. Les cultures sont réalisées en bioréacteurs de laboratoire (2 litres de capacité) à agitation mécanique.

A l'optimum de production des enzymes, (en général au 3ème jour d'incubation de la culture), le substrat végétal source d'acide férulique estérifié est ajouté à la culture de *A. niger* I-1472 à raison d'une quantité correspondant à 0,3 à 1,5 g d'acide férulique par litre de culture et par jour.

La bioconversion de l'acide férulique libéré en acide vanillique est suivie par HPLC. L'analyse HPLC s'effectue sur des aliquots du milieu de culture prélevés à intervalles de temps réguliers et filtrés sur fibres de verre.

Les conditions d'analyse sont les suivantes : Colonne HPLC MERCK LICHROSPHER 100 RP18 (5 μ m, 125 x 4 mm), maintenue à 30°C ; débit de 0,75 mL/minute ; détection UV à 280 nm.

Solvant d'élution : A : 0,01% d'acide acétique dans l'eau ; B : méthanol. Le profil d'élution est le suivant : 20% de solvant B pendant 4 minutes ; gradient linéaire de 20 à 40% de solvant B pendant 24 minutes ; 100% de solvant B pendant 2 minutes ; retour à 20% de solvant B et équilibrage de la colonne pendant 5 minutes.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau V ci-dessous, à l'optimum de production d'acide vanillique à partir des différentes sources d'acide férulique utilisées. La quantité d'acide férulique consommé correspond à la différence entre la quantité totale d'acide férulique ajouté à la culture sous forme de substrat végétal, et la quantité totale d'acide férulique présent dans la culture au moment du dosage (il n'est pas possible de mesurer directement la quantité d'acide férulique libéré, du fait qu'en présence des cellules d'A. niger, celui-ci est immédiatement converti en acide vanillique au fur et à mesure de sa libération)

Tableau V

Source d'acide férulique	Quantité totale d'acide férulique lié ajouté à la culture (mg/L)	Quantité d'acide férulique consommé (mg/L)	Acide vanillique produit (mg/L)
Son de maïs natif	600	0	0
Autoclavat de son de maïs	4240	3460	1400 (après 7 jours de culture)
Pulpe de betterave	600	0	0
Hydrolysats 1 de pulpe de betterave	1680	1160	350 (après 6 jours de culture)
Hydrolysats 2 de pulpe de betterave	4240	3730	950 (après 7 jours de culture)

On observe une production maximale d'acide vanillique lorsque les substrats végétaux riches en oligosaccharides féruloylés (hydrolysats de pulpe de betterave et autoclavats de son de maïs) servent de sources d'acide férulique. L'acide férulique est donc libéré par les enzymes induites de *A. niger* I-1472 et immédiatement biotransformé en acide vanillique par les enzymes intracellulaires, à raison de 1400 mg/L en 7 jours avec un rendement molaire de 46% par rapport à l'acide férulique consommé, et de 950 mg/L en 7 jours avec un rendement molaire de 29% par rapport à l'acide férulique consommé, lorsque l'autoclavat de son de maïs et l'hydrolysats 2 (riche en acide férulique estérifié au galactose) sont respectivement utilisés comme source d'acide férulique.

EXEMPLE 7 : BIOCONVERSION DIRECTE DE L'ACIDE FÉRULIQUE PRÉSENT DANS DES CO-PRODUITS AGRICOLES OU LEURS FRACTIONS EN ACIDE VANILLIQUE PAR *A. NIGER* I-1472 CULTIVÉ EN PRÉSENCE DE PULPE DE BETTERAVE

Dans cet exemple, la source carbonée inductrice d'enzymes est la pulpe de betterave. Le son de maïs, l'autoclavat de maïs, la pulpe de betterave ou ses hydrolysats 1 ou 2 sont utilisés comme source d'acide férulique.

La production d'acide férulique et d'acide vanillique par *A. niger* I-1472 est suivie comme indiqué à l'exemple 6 ci-dessus.

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VI suivant, à l'optimum de production d'acide vanillique à partir des différentes sources d'acide férulique utilisées.

5

Tableau VI

Source d'acide férulique	Quantité totale d'acide férulique lié ajoutée à la culture (mg/L)	Quantité totale d'acide férulique consommé (mg/L)	Acide vanillique produit (mg/L)
Son de maïs natif	600	0	0
Autoclavat de son de maïs	3750	3290	2200 (après 7 jours de culture)
Pulpe de betterave	600	350	50 (après 6 jours de culture)
Hydrolysats 1 de pulpe de betterave	900	650	150 (après 4 jours de culture)
Hydrolysats 2 de pulpe de betterave	900	770	270 (après 4 jours de culture)

Ces résultats montrent que l'utilisation de pulpe de betterave comme source carbonée inductrice conduit à des résultats de bioconversion directe meilleurs que ceux observés dans le cas de l'utilisation du son de maïs comme source carbonée inductrice ; ceci est en accord avec les résultats sur les potentialités des enzymes de *A. niger* I-1472 induites dans ces conditions (exemples 1 et 2). En effet, dans le cas des cultures effectuées en présence de pulpe de betterave l'on observe pour les enzymes de dépolymérisation et les osidases, un spectre d'activités enzymatiques plus large et des niveaux d'activité plus élevés que dans le cas des cultures réalisées en présence de son de maïs ; ceci permet la libération d'une plus grande quantité et d'une plus grande variété d'oligosaccharides féruloylés utilisés comme substrat par les férulate estérases.

D'autre part, une production maximale d'acide vanillique est obtenue lorsque l'autoclavat de son de maïs est utilisé comme substrat végétal source d'acide férulique. Dans les cultures réalisées en présence de pulpes de betterave comme source carbonée inductrice des enzymes de dépolymérisation et des osidases, l'ajout

d'autoclavat de maïs induit en outre les activités férulate estérases.

L'acide férulique libéré par les enzymes induites de *A. niger* I-1472 est ensuite très efficacement biotransformé en acide vanillique par les enzymes intracellulaires, à raison de 2200 mg/L en 7 jours avec un rendement molaire de 77% par rapport à l'acide férulique consommé.

Il est à noter que l'acide férulique lié présent dans les pulpes de betterave et leurs hydrolysats utilisés comme substrat végétal source d'acide férulique a également été bioconverti directement en acide vanillique, bien qu'à un niveau moindre.

EXEMPLE 8 : BIOCONVERSION DIRECTE DE L'ACIDE FÉRULIQUE PRÉSENT DANS L'AUTOCLAVAT DE MAÏS EN ACIDE VANILLIQUE PAR *A. NIGER* I-1472 CULTIVÉ EN PRÉSENCE D'HYDROLYSATS DE PULPE DE BETTERAVE

Dans cet exemple, les sources carbonées inductrices d'enzymes sont les hydrolysats 1 et 2 de pulpe de betterave. L'autoclavat de maïs est utilisé comme substrat végétal source d'acide férulique

La production d'acide férulique et d'acide vanillique par *A. niger* I-1472 est suivie comme indiqué à l'exemple 6 ci-dessus.

Les résultats obtenus à l'optimum de production d'acide vanillique sont illustrés par le Tableau VII suivant :

Tableau VII

Source carbonée inductrice	Quantité totale d'acide férulique lié ajoutée à la culture (mg/L)	Quantité totale d'acide férulique consommé (mg/L)	Acide vanillique produit (mg/L)
Hydrolysats 1 (riche en acide férulique estérifié à l'arabinose)	3300	3150	1260 (après 7 jours de culture)
Hydrolysats 2 (riche en acide férulique estérifié au galactose)	3300	3180	1550 (après 7 jours de culture)

La production d'acide vanillique par *A. niger* I-1472 à partir de l'acide férulique contenu dans l'autoclavat de maïs est de 1260 mg/L après 7 jours (soit un rendement molaire de 46% par rapport à l'acide férulique consommé), lorsque l'hydrolysats 1 sert de source carbonée inductrice, et de 1550 mg/L après 7 jours (soit un rendement molaire de 56% par rapport à l'acide férulique consommé), lorsque l'hydrolysats 2 sert de source carbonée inductrice.

REVENDICATIONS

1) Procédé d'obtention de cultures d'*Aspergillus niger* à large spectre d'activité enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'au moins une souche d'*Aspergillus niger* en présence d'au moins une source carbonée inductrice choisie dans le groupe constitué par :

- la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide ;
- un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de sons de différentes céréales, ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par autoclavage dudit son ou dudit mélange.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la source carbonée inductrice est présente dans ledit milieu de culture à une concentration comprise entre 1 et 50 g/L et de préférence entre 2,5 et 30 g/L.

3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la culture d'*Aspergillus niger* comprend au moins la souche CNCM I-1472.

4) Procédé d'obtention d'une préparation enzymatique à large spectre d'activité, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre du procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, et la récupération du surnageant de culture.

5) Préparation enzymatique, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 4.

6) Procédé de production d'acide férulique libre à partir d'un substrat féruloylé, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit substrat avec au moins une culture d'*Aspergillus*

niger obtenue par le procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, ou avec au moins une préparation enzymatique selon la revendication 5, dans des conditions permettant la libération de l'acide férulique par les
5 enzymes présentes dans ladite culture ou ladite préparation enzymatique.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le substrat féruloylé est choisi parmi :

- 10 - la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide ;
- un son de céréale, notamment de maïs, ou un mélange de sons de différentes céréales, ou au moins une de ses
15 fractions solubles riches en oligosaccharides féruloylés, susceptibles d'être obtenues par autoclavage dudit son ou dudit mélange.

8) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'on
20 additionne au milieu de culture d'*Aspergillus niger* une quantité de substrat féruloylé correspondant à 0,1 à 50 g d'acide férulique par litre de milieu de culture.

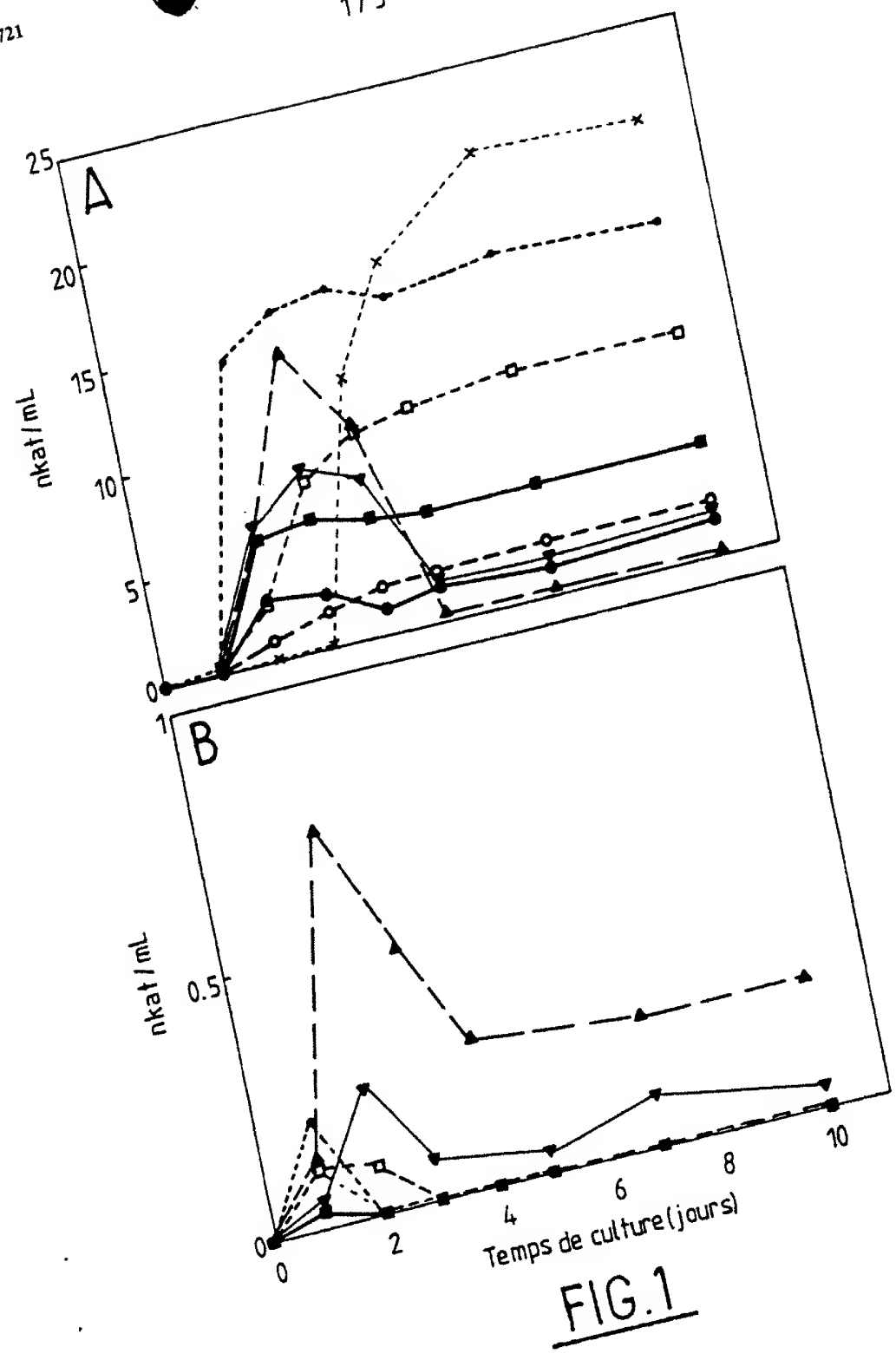
9) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'on mélange
25 la préparation enzymatique avec une quantité de substrat féruloylé correspondant à 0,1 à 40 g d'acide férulique pour 1 gramme de protéines totales de préparation enzymatique.

10) Procédé selon une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que la culture
30 d'*Aspergillus niger* ou la préparation enzymatique sont produites en présence d'une source carbonée inductrice comprenant de la pulpe de betterave ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés
35 susceptibles d'être obtenues par hydrolyse acide, et en ce que le substrat féruloylé comprend au moins un son de

céréale ou au moins une de ses fractions riches en oligosaccharides féruloylés susceptibles d'être obtenues par autoclavage.

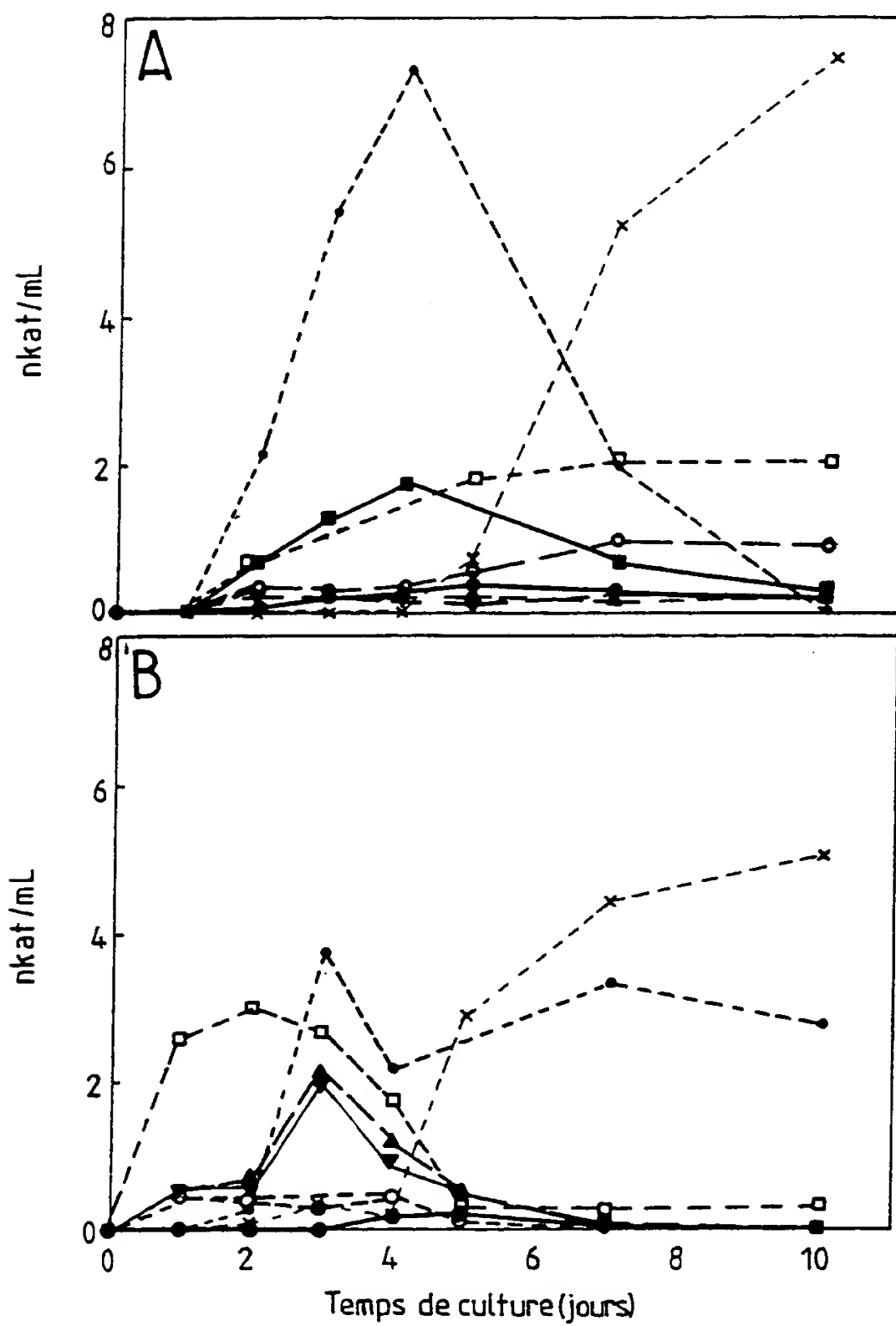
- 11) Procédé selon une quelconque des
5 revendications 6 à 8, ou 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre la bioconversion directe de l'acide férulique en acide vanillique par la culture d'*Aspergillus niger*.

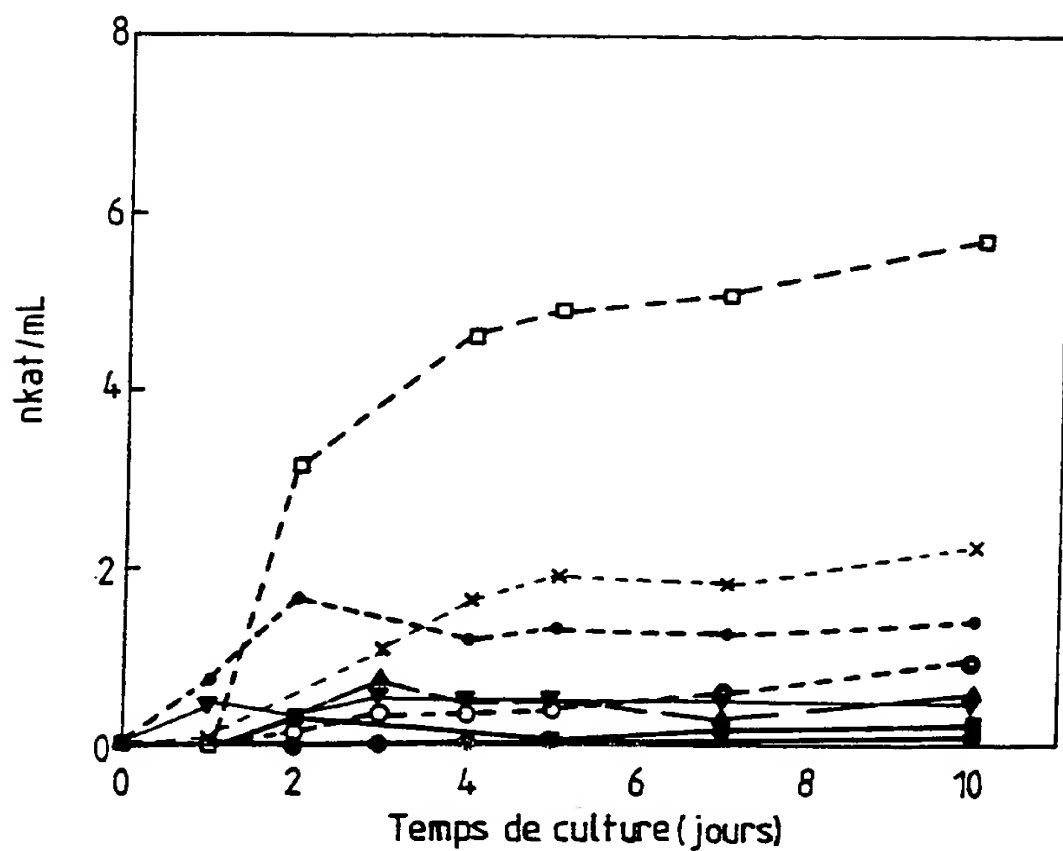
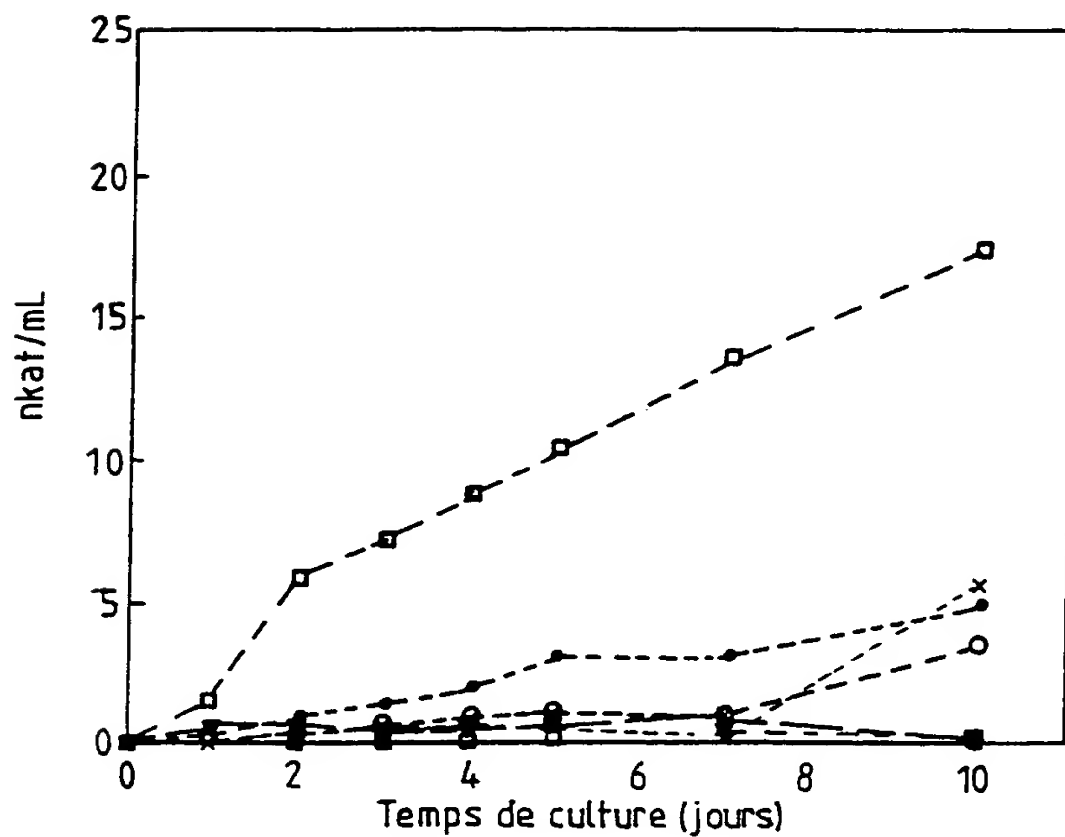






2 / 3

FIG. 2

FIG. 3FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00966

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/14 C12P7/42 C12P7/24 //(C12N1/14,C12R1:685)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KROON P A ET AL: "RELEASE OF FERULIC ACID FROM SUGAR-BEET PULP BY USING ARABINANASE, ARABINOFURANOSIDASE AND AN ESTERASE FROM ASPERGILLUS NIGER" BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, US, ACADEMIC PRESS, vol. 23, no. 3, 1996, page 263-267 XP000603360 ISSN: 0885-4513	1-10
Y	abstract page 264, column 1, paragraph 1 -/-	11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 July 2000

Date of mailing of the International search report

26/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00966

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LESAGE-MEESEN L ET AL: "Fungal transformation of ferulic acid from sugar beet pulp to natural vanillin" JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE., vol. 79, March 1999 (1999-03), pages 487-490, XP002124793 ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING., GB ISSN: 0022-5142	11
A	the whole document	1-10
X	MICARD V ET AL: "STUDIES ON ENZYMIC RELEASE OF FERULIC ACID FROM SUGAR-BEET PULP" LEBENSMITTEL WISSENSCHAFT UND TECHNOLOGIE, GB, LONDON, vol. 27, no. 1, 1994, page 59-66 XP000603509 abstract table 3	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 00/00966

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
CIB 7	C12N1/14	C12P7/42 C12P7/24 //(C12N1/14,C12R1:685)
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12P C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KROON P A ET AL: "RELEASE OF FERULIC ACID FROM SUGAR-BEET PULP BY USING ARABINANASE, ARABINOFURANOSIDASE AND AN ESTERASE FROM ASPERGILLUS NIGER" BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY,US,ACADEMIC PRESS, vol. 23, no. 3, 1996, page 263-267 XP000603360 ISSN: 0885-4513	1-10
Y	abrégé page 264, colonne 1, alinéa 1 — -/-	11
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 20 juillet 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26/07/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Lejeune, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 00/00966

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	LESAGE-MEESEN L ET AL: "Fungal tranformation of ferulic acid from sugar beet pulp to natural vanillin" JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE., vol. 79, mars 1999 (1999-03), pages 487-490, XP002124793 ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING., GB ISSN: 0022-5142	11
A	le document en entier	1-10
X	MICARD V ET AL: "STUDIES ON ENZYMIC RELEASE OF FERULIC ACID FROM SUGAR-BEET PULP" LEBENSMITTEL WISSENSCHAFT UND TECHNOLOGIE, GB, LONDON, vol. 27, no. 1, 1994, page 59-66 XP000603509 abrégé tableau 3	1-10